

特集

第12回 日本バイオセラピー学会学術集会総会

● ワークショップ BRM・サイトカイン治療 (1) ●

新生血管阻害剤と内因性 IL-12 とを用いた新免疫療法 —特に NKT 細胞の関与について—

*¹ 近畿大学腫瘍免疫等研究所, *² オリエント三陽クリニック,*³ 福島県立医科大学医学部・第二外科

八木田旭邦*¹ 丸山 正二*¹ 助川 寧*¹ 大洞 あや*¹
 小林 寿彰*² 藤井 孝美*² 竹内 正七*² 竹之下誠一*³

要旨 IL-12 は Th1 系の免疫系を様々な部位において強力な活性化作用を有するサイトカインである。

現在試行している免疫療法は新生血管阻害作用を有する β シャーク MC/LO (20g/日), Th1 系の (マウス/ヒト) に作用して IL-12 を誘導する担糸菌製剤の AHCC (3.0g~6.0g/日) あるいは IL-X (3.0~6.0g/日) と Th2 系に働く PSK (3.0g/日) とを単独あるいは併用で行う新免疫療法 (仮称) である。

1997 年 9 月より治療した症例は 6,000 余例であるが, 3 か月以上投薬が可能で免疫学的な検査が複数回可能であった例は 1,317 例である。その結果, CR 242 例 (18%), PR 362 例 (27%) で奏効率が 604 例 (45%) であった。

TNF α , IFN γ , IL-12, IL-4, IL-10, IL-18 の各種サイトカインと CD4 \times IFN γ /IL-4 の Th1/Th2 比, NK 活性および NKT 細胞 (CD161) についても検討した。

IL-12 は TNF α , IFN γ および IL-18 と相関を示し NK 活性とは相関を示さなかった。また IL-12 と IL-10 とは逆相関を示した。IL-4 は再現性に問題があり一定の傾向を示さなかった。

NKT 細胞は CD56 (+), CD161 (+), CD3 (+) の表面マーカーで測定したが CR+PR+NC と高い相関を示したものは CD3 (+) CD161 (+) であり, カットオフ値は 10% が妥当であると判定された。Th1/Th2 比は 7.0 がカットオフ値と考えられた。

また Th1/Th2 比は NKT 細胞と IL-12 で活性化される CTL との総和が臨床データと相関を示すことが示唆された。

Th1/Th2=NKT 細胞+IL-12 activated CTL

すなわち本療法は IL-12 誘導のみならず NKT 細胞の活性化作用をも惹起している可能性が示唆された。

[Biotherapy 14 (5): 433-439, May, 2000]

Proc. JSBT (Japan Society for Biological Therapy), 1999 (abstr. 46)

Novel Immunotherapy Using an Angiogenesis Inhibitor and Human Natural (Hn) IL-12 Inducers—Particularly on the Participation of NKT Cells

Akikuni Yagita*¹, Shoji Maruyama*¹, Yasushi Sukegawa*¹, Aya Daido*¹,
Toshiaki Kobayashi*², Takayoshi Fujii*², Shoshichi Takeuchi*² and Seiichi Takenoshita*³

*¹ Institute of Immunotherapy for Cancer Kinki University,

*² Orient Mitaka Clinic,

*³ Department of Surgery II, Fukushima Medical University School of Medicine

Summary

IL-12 is a cytokine with a strong potentiative action in the various cites of the immune system of the Th1 immune line.

The immunotherapy we performed in the present clinical trials is a novel immunotherapy used alone or in combination with β shark MC/LO (20g/day), which has an angiogenesis inhibitory action, and AHCC

(3 g~6 g) composed of preparations of *Vasidlomyces* mycelium which induce IL-12 that acts on Th1 immune line (mouse/human) and PSK (3.0 g/day) that acts on the Th2 immune line.

The number of cases treated since September 1997 is about 6,000. The number in which it has been possible to administer the drugs for more than 3 months and perform multiple immunological tests is 1,317.

The data from these cases showed 242 cases of CR (18%) and 362 cases of PR (27%); consequently, the number of efficacious cases reached 604 (45%).

A variety of cytokines, such as $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-12, IL-4, IL-10, IL-18, Th1/Th2 ratio of $CD4 \times IFN\gamma / IL-4$, NK cell activity and NKT cell (CD161) were also examined. IL-12 showed a positive correlation with $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ and IL-18, but not with NK activity, and a negative correlation with IL-10. IL-4 did showed no definite tendency because of the problem of the unstable reproducibility of this correlation. NKT cells were determined by surface markers of CD56(+), CD161(+) and CD3(+). Those markers showing a high correlation with CR+ PR+NC were CD(+) and CD161(+). The cutoff value was 10%. Seven was considered the cut off value in the ratio of Th1/Th2.

Furthermore, the ratio of Th1/Th2 suggested that NKT cells and the sum of CTL activated by IL-12 showed a positive correlation with the clinical data. Th1/Th2=NKT cells and CTLs were activated by IL-12.

Consequently the possibility was suggested that this therapy caused not only the inducible action for IL-12, but also the activating action of NKT cells.

Key words: IL-12 inducer, Th1/Th2, NKT cell

Address request for reprints to: Dr. Akikuni Yagita, Institute of Immunotherapy for Cancer Kinki University, 377-2 Ohno-higashi, Osaka-Sayama 589-8511, Japan

はじめに

インターロイキン 12 (IL-12) は、Th1 系の免疫反応に対し様々な部位を活性化させ得る点で癌治療において理想的なサイトカインである。

この IL-12 は NK 細胞を活性化させ得るものとして初めて見いだされたが¹⁾、LAK 細胞やキラー T 細胞 (CTL) の活性化作用も認められ、かつ細胞性免疫を強化するインターフェロン γ ($IFN\gamma$) の産生増強作用も認められている。

また、癌抗原 (HLA-class I と II) の発現増強作用の他に、 $IFN\gamma$ の存在下で腫瘍新生血管に対する阻害作用も知られている。

したがって、IL-12 は癌治療において最も理想的なサイトカインの一つと考えられ、動物実験でも多くの論文が報告されている^{2,3)}。

この IL-12 は 2 種類の異なる染色体で作られた遺伝子産物のヘテロダイマーであるが、米国では遺伝子操作でこの IL-12 を大量に作製することに成功した (recombinant IL-12: rt-IL-12)。

しかし、この rt-IL-12 は臨床に応用した場合に少なからぬ副作用を惹起し、その臨床応用が困難となっている。

1993 年にある種の菌糸体成分である AHCC

(active hexose correlated compound) を用いて進行末期癌症例に高い抗腫瘍効果を見いだしたが、1996 年になり有効症例のマクロファージが高い内因性の IL-12 産生能力をもっていることを初めて見だし特許を出願した。

その後、多くの症例を集積し Th1 系のサイトカイン ($TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-12, IL-18) および Th2 系のサイトカイン (IL-4, IL-10, $TGF\beta$)、 $CD4 \times IFN\gamma / IL-4$ (Th1/Th2 比) のスリーカラー、最近では NKT 細胞の表面マーカーであると考えられる CD161 についても検討を加えたので報告する⁴⁻⁷⁾。

I. 新免疫療法の臨床成績

臨床的效果を表 1 に示した。

症例は 1997 年 9 月から 1999 年 6 月末までの悪性腫瘍患者で 3 か月以上の免疫療法が可能でかつ 2 回以上の免疫学的測定ができた症例が 1,317 例で、その内容は多い順から肺癌 226 例、乳癌 191 例、胃癌 139 例、結腸直腸癌 192 例、その他 569 例であった。

効果判定は日本癌治療学会の評価基準に従い、画像診断と腫瘍マーカーで行った。

免疫治療は、Th1 系マウスに応答する AHCC

表1 効果一覧

	CR	PR	NC	PD	計	奏効率 (%)
肺癌	34	60	85	47	226	41.6
乳癌	44	47	65	35	191	47.6
胃癌	23	35	58	23	139	41.7
結腸癌	18	16	37	39	110	30.9
直腸癌	11	19	26	26	82	36.6
肝癌	15	29	25	17	86	51.2
卵巣癌	21	24	21	10	76	59.2
子宮癌	11	11	18	8	48	45.8
前立腺癌	11	11	6	6	34	64.7
脾癌	0	9	10	6	25	36.0
食道癌	6	8	10	3	27	51.9
腎癌	3	15	8	1	27	66.7
悪性リンパ腫	4	5	9	0	18	50.0
咽頭癌	2	4	7	1	14	42.9
甲状腺癌	2	3	5	1	11	45.5
胆管(道)癌	0	6	5	4	15	40.0
脳腫瘍	2	4	3	0	9	66.7
精巣腫瘍	4	6	4	0	14	71.4
軟部腫瘍	1	2	6	0	9	33.3
悪性黒色腫	1	1	1	0	3	66.7
その他	29	47	63	14	153	49.7
	242	362	472	241	1,317	45.9

(3.0g~6.0g/日), Th2系マウスに応答するPSK: クレスチン(3.0g/日), 新生血管阻害作用を有する β シャークMC(20g/日), アルファロール: 活性型Vitamin D₃(1.0 μ g/日), ウルソ: ウルソデスオキシコール酸(300~600mg)を投与した。

原則として放射線および抗癌剤は併用しない治療法である。

CR症例は242例で18.4%, PRが362例の27.5%であり, 奏効率は45.9%であった。また, NCが472例で35.8%であり, かなりの腫瘍の増殖抑制作用があることがわかった。

なかでも有効性が高い疾患群が泌尿器系の疾患で, 精巣腫瘍が71.4%, 腎癌が66.7%, 前立腺癌が64.7%であった。

また, 悪性黒色腫や脳腫瘍にも60%台の成績が特記すべき点と考えられる。

II. 精巣腫瘍の治療成績

新免疫療法で最も成績のよかった精巣腫瘍において極めて特徴的成績が得られた(表2)。

表2 新免疫療法における精巣腫瘍の治療成績

	有効	無効
HCG産生腫瘍	7 (87.5%)	1 (12.5%)
AFP産生腫瘍	1 (33.3%)	2 (66.7%)
AFP+HCG産生腫瘍	0 (0.0%)	1 (100.0%)

Inst. Of immunotherapy for Cancer,
Kinki Univ. 1999.08.16

それは, HCG産生腫瘍の治療成績が8例中7例の87.5%であるのに対し無効例が1例の12.5%であった。これらの8例は癌専門病院か大学病院で既存の治療法(手術, 放射線あるいは抗癌剤)に無効であった症例である。

一方, AFP産生腫瘍は4例中1例の25.0%にすぎなかった。

III. IL-12と各種サイトカインあるいは免疫能力との相関

IL-12とNK細胞活性, IL-12とIFN γ , IL-12とTNF α およびIL-12とIAPとの相関を図1に

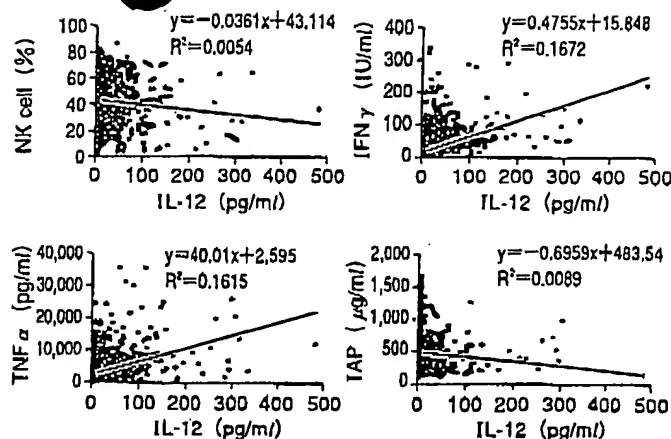


図 1 All over (n = 1,400)

示した。

NK細胞活性とIL-12との相関は以前にも報告したように、症例が増加しても正の相関は得られずむしろ逆相関の傾向が示された^{6,7)}。

この事実、ヒトとマウスとはまったく逆の結果が得られている^{3,4)}。

TNF α とIL-12はゆるい相関が得られた。IFN γ とIL-12とも同様にゆるいながらも相関が示唆された^{6,7)}。

また、IAPとIL-12とは逆の傾向が得られている。

IV. NKT細胞と表面マーカーとの相関

新免疫療法で内因性IL-12誘導作用が認められることはすでに報告した。

最近、NKT細胞と最も相関が高いことを示す表面マーカーはCD161との報告がある。

今回、NK細胞の表面マーカーであるCD56およびT細胞の表面マーカーであるCD3を用いてCD161を中心としてmono color, two colorおよびthree colorとでCRとPRおよびNC症例、すなわち新免疫療法である程度の有効性が認められた42例で検討を加えた(図2)。

最も高い相関が得られたものは、CD161とCD3 \times CD161との相関が $y=1.247x+7.6884$, $R^2=0.56881$ であり、次いでCD3 \times CD56 \times CD161とCD3 \times CD161が $y=0.339x+1.3844$, $R^2=0.5541$ であった。その他のCD56を含む相関は得られなかった。

以上の結果からCD3 \times CD161が臨床的有効性

との高い相関が得られた。これ以後、NKT細胞の標識としてCD3 \times CD161とする。

また、紙面の制限もありCD3 \times CD161における有効性を示すカットオフ値は説明できないが、Th1/Th2比(CD4 \times IFN γ /IL-4)のカットオフ値7.0との相関から10.0と暫定的に決めた。

ヒト癌における現時点での細胞障害性を示す細胞はNK細胞はほとんど主役でなく、IL-12で活性化されたkiller T細胞とNKT細胞の2種類と想定される。

すでに、Th1/Th2比の臨床的抗腫瘍効果を示すカットオフ値が7.0であり、Th1優位となるに従いこの値は大きくなることを報告した⁵⁻⁷⁾。

そう仮定した場合IL-12が7.8 pg/ml以上の活性が認められた症例は50%強を占めるにすぎないことは報告した。

しばらくの期間、この細胞障害性(Th1/Th2比)を示す細胞の存在が不明であった。

しかし、NKT細胞の表面マーカーであるCD3 \times CD161でCR+PR症例を検討したところ、IL-12で活性化したCTLとNKT細胞とで有効例をほぼ完全に説明することができることが判明した。

すなわち、新免疫療法によって活性化されるeffector細胞は、IL-12で活性化したCTL細胞とNKT細胞との2種類であることが判明した。

V. 新免疫療法におけるIL-12活性化細胞とNKT細胞

NKT細胞とIL-12で活性化されたCTLとが本治療法でどのように関与しているのかにつき検討

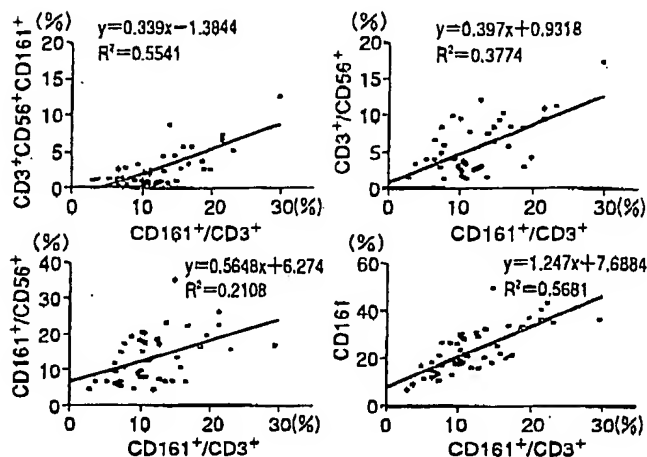


図2 CR, PR, NC症例における相関 (n=42)

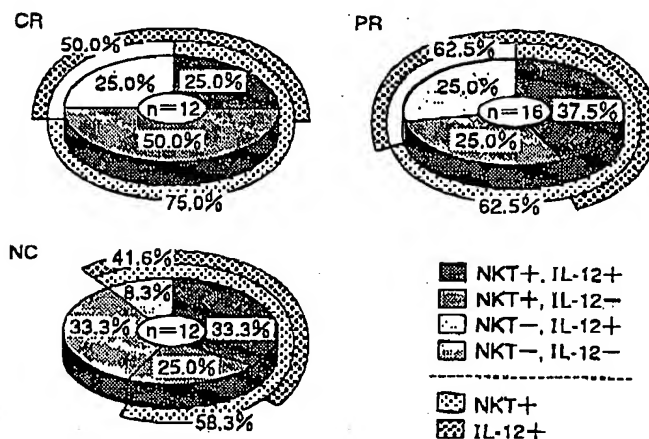


図3 NKT細胞とIL-12の相関

した (図3)。

判定の基準はすでに述べたが、NKT細胞のなかでCD3×CD161のダブルポジティブ細胞が10%を超えているか、もしくはIL-12が7.8 pg/ml以上の産生が認められているか否かで判定した。

CR症例は12例で検討した。IL-12産生が7.8 pg/ml以上産生されていた症例は、6例の50.0%に認められた。また、NKT細胞が10%以上増加していた症例は9例の75.0%であった。そして、IL-12とNKT細胞とが両者ともに基準を越えている症例は25.0%の3例であった。

PR症例は16例であったが、IL-12が関与したと考えられる症例は62.5%であり、NKT細胞が作用したと考えられる症例は62.5%と同率であった。また、両者がともに関与したと考えられる症

例は37.5%であった。

NC症例は12例で、IL-12が関与した症例は41.6%で、NKT細胞の関与症例は58.3%であった。また、両者の関与があったと考えられるものは33.3%であった。しかし、IL-12およびNKT細胞のいずれの関与も示唆されない症例が33.3%認められた。

VI. 考 察

1993年に免疫活性作用が認められる菌糸体成分のAHCC単独経口投与(3.0g~6.0g/日)を進行末期癌に開始し、数%ではあるが著明な改善効果が認められた。その後、新生血管阻害作用を有するβシャークMC(20g/日)を加え10数%までにレベルアップが可能となった。

1996年の8月になり AHCC 投与群の有効例の末梢血 Mφ から IL-12 が産生されていることが初めて見いだされた。このころから一部の症例で各種サイトカインと免疫能力の測定が開始され有効例の背景に Th1 系の免疫系が作用していることが確認された。

ちょうどこのころ、クレスチン (PSK) が Th2 マウスで IL-12 産生能力が高く⁸⁾、AHCC が Th1 マウスで IL-12 産生能力が高いこと、次いで、IL-12 産生能力は TNF α の産生能力と相関することが解明された。ついで Th1 サイトカインカスケード、すなわち TNF α 1,000 pg/ml 以上の産生能力が認められて、後に IFN γ が 10 IU/ml 産生され、最後に IL-12 の産生能力が亢進するという時間的経過をたどることが判明した^{5-7, 11, 12)}。

Th1 マウスで初期癌では IL-12 を産生するが、進行癌になると IL-12 が産生できず PSK との併用投与でのみ IL-12 産生が可能になることを見いだした。このような状態は可逆的 Th2 免疫状態と命名した。

ヒト癌でも免疫抑制が過重な進行末期癌では AHCC のみでは IL-12 の産生能力が賦活しないが、PSK の併用投与で IL-12 が産生され臨床的改善が初めて得られることが判明した。

この時点で肺癌の有効率が著しく改善し適格な免疫状態の把握と薬剤の投与により、さらに有効率のレベルアップにつながったと考えられる。

1,317 例中 604 例の変効率 (45.9%) が得られるようになったことは、以上の経過があったのである。

また、この新免疫療法が、NK 細胞はほとんど働いておらず IL-12 により活性化された CTL のみで作用していると考えていたが、Th1/Th2 比が測定できるようになり大きな矛盾があることに気が付いた。

臨床的に明らかに PR あるいは CR と判定され、かつ Th1/Th2 比が 7.0 をはるかに超えているにもかかわらず、IL-12 が産生されていない症例が 40 数%認められた。

ちょうどこのころ、千葉大学大学院医学研究科・高次機能系免疫発生学の谷口 克教授らが NKT 細胞の存在を報告された。1999 年の 6 月になり NKT 細胞の表面マーカーとして CD161 の発見が

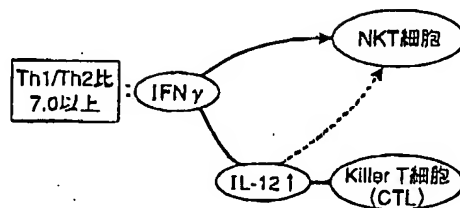


図 4 Th1 細胞性免疫の活性

あり、CD56, CD3, CD161 の表面マーカーを検討したところ本稿でも述べたごとく、CD3×CD161 が NKT 細胞の表面マーカーとして有用であることがわかった。

その結果、Th1/Th2 比で IL-12 産生グループの他に NKT 細胞が活性化しているグループの存在することがわかった。新免疫療法で有効性を示す症例の免疫能力は現時点では「Th1 細胞性免疫の活性」図 4 に示したようになるとの仮説を立てている。

Th1/Th2 比が活性化するためには IFN γ が大量に産生されることが原点と考えられる。

そして、Th1/Th2 比は NKT or/and CTL であり、かつ生体が NKT 細胞の活性化に向かうか、IL-12 の産生を亢進させて CTL 細胞を働かせるかのどちらかであると考えられる。今のところ、このスイッチが何によって control されているか不明だが、生体はたくみにどちらかの effector 細胞が必要かを選択して control しているように感じられる。

現在、この NKT 細胞をさらに活性化する試みもすでに始まっている。

また、内因性 IL-12 誘起剤として AHCC を越える物質も製剤化が可能になった (IL-X)。

今後、新免疫療法もさらなる有効性のレベルアップをめざして研究を重ねるつもりである。

おわりに

従来の癌治療法もある程度の成績を上げているものの、副作用や QOL を著しく低下せざるを得ない。

これに対し、新免疫療法は従来の癌治療成績をはるかに上回るのみならず long term NC も得られ、かつ副作用もほとんどなく QOL の改善も認められる。そしてたとえ抗癌剤あるいは放射線と

の併用があってもその副作用を軽減できる点は、21世紀における癌治療の主役に踊りでるものと推察される。

文 献

- 1) Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M. et al.: Identification and Purification of Natural Killer cell Stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Med.* 170: 827-845, 1989.
- 2) 西村孝司: IL-12を用いた Th1/Th2 バランスの制御と免疫病治療への応用. *最近医学* 51(10): 87-100, 1996.
- 3) 西村孝司: IL-12によって活性化される Th1 主導免疫の癌治療における意義. *Biotherapy* 11(7): 820-828, 1997.
- 4) 八木田旭邦: 進化しつづける新免疫療法 "癌細胞が消えた". 二見書房, 東京, 1998, pp. 238-250.
- 5) 八木田旭邦: AHCC によって誘導される IL-12 "癌患者新たな選択". メタルモ出版, 東京, 1998, pp. 244-252.
- 6) 八木田旭邦: 今話題の癌民間療法 "新しい癌免疫化学療法の指針". 医薬ジャーナル, 大阪, 1999, pp. 246-251.
- 7) 八木田旭邦: 三つの柱からなる「新免疫療法」新免疫療法で癌に克つ. 講談社, 東京, 1999, pp. 81-110.
- 8) 八木田旭邦, 丸山正二, 助川 寧: IL-12 誘起物質と新生血管阻害剤とを用いた BRM 療法の臨床成績. 新しい癌免疫化学療法の指針, 医薬ジャーナル社, 大阪, 1999, pp. 194-197.
- 9) Bix, M., Lock, S. E. and Costa, P.: Natural T cells, Cells that co-express NKRP-1 and TCR. *J. Immunol.* 155(3): 1020-1022, 1995.
- 10) Al-Aoukaty, A., Rolstad, B. and Maghazachi, A. A.: Functional Coupling of NKRP-1 receptor to various heterotrimeric G proteins in rat interleukin-2 activated Natural Killer Cells. *J. Biol. Chem.* 272(50): 31604-31608, 1997.
- 11) 八木田旭邦, 伊藤 久, 渡辺 寧・他: MHC System における TNF gene の heterogeneity と TNF 産生能. *消化器と免疫* 24: 17-20, 1990.
- 12) 八木田旭邦: 腸疾患とサイトカイン, サイトカイン, メジカルビュー社, 東京, 1991, pp. 58-59.